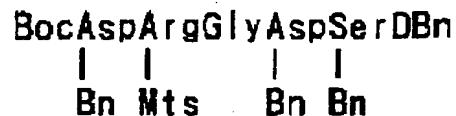


## **CONFIDENTIAL INFORMATION**

## **Patent Abstracts of Japan**

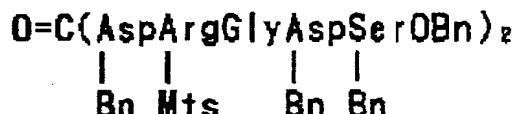
PUBLICATION NUMBER : 06298797  
PUBLICATION DATE : 25-10-94



APPLICATION DATE : 12-04-93  
APPLICATION NUMBER : 05084735

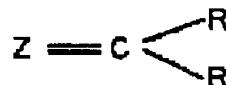
APPLICANT : FUJI PHOTO FILM CO LTD;

**INVENTOR :** AZUMA ICHIRO;



INT.CL. : C07K 7/06 A61K 37/02 C07K 7/08 //  
C07K 99:00 .

**TITLE** : PEPTIDE DERIVATIVE AND ITS USE



**ABSTRACT :** PURPOSE: To provide a new peptide derivative derived from an adhesive core sequence peptide of a cell adhesive protein fibronectin, having high cell adhesion property and cancer metastasis suppressive action, free from toxicity, stable in blood and useful as a cancer metastasis suppressing agent, etc.

**CONSTITUTION:** The peptide derivative of formula III (Z is O or S; R is oligopeptide residue containing Arg-Gly-Asp as an essential constituent unit) is produced by reacting a compound of the formula Boc-Ser(Bn)-OH (Boc is t-butoxycarbonyl; Bn is benzyl) with benzyl bromide in the presence of a base, removing aminoprotecting group, successively reacting with the compounds of the formulas Boc-Asp(Bn)-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Arg(Mts)-OH (Mts is mesitylenesulfonyl) and Boc-Asp(Bn)-OH, reacting the resultant protected peptide of formula I with carbonyldiimidazole in the presence of trifluoroacetic acid, etc., and removing protecting groups from the obtained compound of formula II.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-298797

(43) 公開日 平成6年(1994)10月25日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 K 7/06	Z NA Z	8318-4H		
A 61 K 37/02	ADU	8314-4C		
C 07 K 7/08		8318-4H		
// C 07 K 99:00				

審査請求 未請求 請求項の数 3 O.L (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願平5-84735	(71) 出願人	000005201 富士写真フィルム株式会社 神奈川県南足柄市中沼210番地
(22) 出願日	平成5年(1993)4月12日	(72) 発明者	森 英登 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真 フィルム株式会社内
		(72) 発明者	小島 政芳 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真 フィルム株式会社内
		(72) 発明者	駒澤 宏幸 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真 フィルム株式会社内
		(74) 代理人	弁理士 中村 稔 (外6名)
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ベブチド誘導体およびその用途

(57) 【要約】

【目的】 癌転移阻害活性の高い新規なベブチド誘導体を提供する。

【構成】 下記一般式(I)で表されるベブチド誘導体またはその薬学上許容できる塩。一般式(I)

【化1】



一般式(I)中、Zは酸素原子または硫黄原子を表す。  
RはA r g - G l y - A s p を必須構成単位として有する3残基以上7残基以下のオリゴベブチド残基を表す。

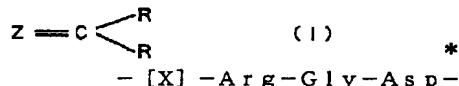
【効果】 本発明のベブチド誘導体は、細胞接着性蛋白質様の活性を充分に保持しており、簡便な手段で合成可能であり、血液中での安定性が高い。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記一般式 (I) で表されるペプチド誘導体またはその薬学上許容できる塩。一般式 (I)

【化1】



- [X] -A r g -G l y -A s p - [Y]

一般式 (II) 中、[ ] は [ ] 内の残基が存在しても存在しなくてもよいことを意味し、存在する場合 X は A s p または G l u 残基を表し、Y は S e r 、 T h r 、 V a l 、 S e r - P r o 、 S e r - P r o - A l a からなる群より選択されるアミノ酸残基またはペプチド残基を表す。

【請求項 3】 薬学上許容できる賦形剤及び請求項 1 または 2 に記載のペプチド誘導体またはその薬学上許容できる塩を有効成分として含有してなる、癌転移抑制剤。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は特定の構成を有するペプチドの誘導体に関するものであり、より詳しくは細胞接着性蛋白質であるフィプロネクチンの接着コア配列ペプチドの誘導体またはその薬学上許容可能な塩、およびその用途に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 フィプロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン等は細胞と結合組織との結合に関与し、また動物細胞の細胞機能に関連した種々の生物活性を有する蛋白質であり、細胞接着性蛋白質と総称される。例えばフィプロネクチンは肝臓で生成され、ヒト血漿中に約 0.3 mg/ml の濃度で存在する糖蛋白質である。

【0003】 フィプロネクチンはその 1 次構造が分子クローニングを用いて決定されており (Koarnblith, A. R. et al., EMBO Journal, 4巻, 2519 (1985))、分子量約 250 K のポリペプチドである A 鎌と約 240 K の B 鎌が C 末端附近でジスルフィド結合した 2 量体蛋白質であることが明らかにされている。またラミニンについても佐々木ら (Sasaki, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81巻, 935 (1987), Sasaki, M. et al., J. Biol. Chem., 262巻, 17111 (1987)) によりその 1 次構造が決定されている。ラミニンは A 、 B 1 、 B 2 とよばれる 3 本のポリペプチド鎖から構成されており、十字架状の構造をとっていることが知られている。

【0004】 そして細胞接着性に関与する結合部位の研究も行われ、フィプロネクチンの細胞接着部のコア配列は A r g -G l y -A s p (RGD) なるトリペプチドであることが 1984 年に報告された (Pierschbacher, M. D. et al., Nature 309巻, 30 (1984))。またラミニンの細胞接着部位のコア配列は T y r -I l e -G l y -S e r -A r g (Y I G S R) で表されるペントペプチドであることも解明されている (Graf, J. et al., Cell

\*一般式 (I) 中、Z は酸素原子または硫黄原子を表す。

R は A r g -G l y -A s p を必須構成単位として有する 3 残基以上 7 残基以下のオリゴペプチド残基を表す。

【請求項 2】 R が下記一般式 (II) で表されるオリゴペプチド残基である、請求項 1 に記載のペプチド誘導体またはその薬学上許容できる塩。一般式 (II)

48巻, 989 (1987)。

【0005】 これらフィプロネクチンやラミニンは、上記コア配列を介して細胞のレセプターと結合することにより各種の情報を細胞に伝達し、またヘパリン、コラーゲン、フィブリリン等の生体高分子とも結合して細胞と結合組織との接着、細胞の分化、増殖に関与しているものと考えられている。

【0006】 このように細胞接着性蛋白質は多様な生物活性を有するため、その活性部位配列ペプチドを用いた研究が精力的になされている。例えばフィプロネクチンの細胞結合部のコア配列の利用としては、ポリマーに RGD 配列を有するペプチドを共有結合させ、人工臓器用基体や動物細胞培養用基体として用いる方法 (特開平 1-309682 号公報、特開平 1-305960 号公報、W0 90/05036 A 特許)、RGD 配列を有するペプチドに疎水性領域を連結することにより目的とするペプチドを固体表面に付着させ、歯科用埋め込み剤や組織培養基体に利用する方法 (W0 90/11297A 特許)、RGD 配列を有する種々の環状及び鎖状オリゴペプチドまたはその類縁体を用いて血小板凝集を阻害する方法あるいは血栓症を予防、治療する方法 (高分子学会予稿集第 38 卷、3149 (1989)、特開平 2-174797 号公報、特開平 3-118330 号公報、特開平 3-11833

1 号公報、特開平 3-118398 号公報、特開平 3-118397 号公報、特開平 3-118333 号公報、W0 91/01331 特許、W0 91/07429 特許、W0 91/15515 特許、W0 92/00995 特許)、RGD ペプチドとヒアルロン酸を共有結合した化合物を用いて血小板凝集を調節する方法 (特開平 4-134096 号公報)、RGD 配列を有するペプチドを細胞移動制御剤として用いる方法 (特開平 2-4716 号公報)、RGD 配列を有するペプチドを固定化した膜を細胞接着膜として用いる方法 (高分子学会予稿集第 37 卷、705 (1988))、RGDS 配列を有するポリペプチドを体外血液用血小板保護剤として用いる方法 (特開昭 64-6217 号公報)、ポリペプチド分子内に細胞接着活性を有するペプチドを附加することにより人工機能性ポリペプチドとして利用する方法 (特開平 3-34996 号公報) 等が開示されている。

【0007】 更に近年、細胞接着性蛋白質は癌転移に関与する生体分子としても注目されてきている。癌転移の一連の段階では、癌細胞は種々の宿主細胞や生体高分子と接触する。このときフィプロネクチンやラミニンのような細胞接着性分子が存在すると、該細胞は多細胞塊を形成し、癌細胞の増殖や生存がより容易になる。ところが、たとえばフィプロネクチンの接着部位コア配列であ

3

るトリペプチドRGDが共存すると、競争的に癌細胞上のフィプロネクチンレセプターと結合するため細胞接着がブロックされ、癌転移抑制作用を示すことが報告されている(Science 238巻, 467 (1986))。

【0008】しかしながらRGDペプチドはそれ単独では細胞接着活性が充分でないため、効果の増強をはかる目的で該配列を有するオリゴペプチド、環状オリゴペプチド、あるいはその繰返し配列を有するポリペプチドを用いて癌転移を制御する方法(Int. J. Biol. Macromo I., 11巻, 23 (1989)、同誌, 11巻, 226 (1989), Jpn. J. Cancer Res., 60巻, 722, (1989)、特開平2-174798号公報)、あるいは腫瘍再発を防止する方法(特開平2-240020号公報)が開示されている。またフィプロネクチン分子中の細胞接着ポリペプチドとヘパリン結合ポリペプチドを構成単位とするポリペプチドを用いて癌転移を抑制する方法(特開平3-127742号公報)も報告されている。

## 【0009】

【発明が解決しようとする課題】上述のように、フィプロネクチンの接着部位コア配列であるArg-Gly-Aspペプチドは様々な生物活性を保持しているため、その応用価値は高いものと考えられる。しかしながら該コア配列の細胞接着活性が充分でないため、それらの癌転移抑制作用は実際の医療に応用するには満足できるものではなかった。また一般に薬物が生体に投与されたのち薬効を維持するためには、それ自体の生物活性の強さのみならず薬物の生体内での安定性(例えば血流中での滞留時間や排泄される時間など)が重要であることが知られている。細胞接着性蛋白質の活性部位コア配列ペプチドも例外ではなく、それ単独ではペプチド類に特有の速い代謝分解や排泄が起り、結果的に所望の効果が期待できない場合も生ずる。そこで生体内での安定性向上させるため従来技術の項で説明したような種々の方法が報告されているが、それらの化合物のなかには未だ生物活性が不充分であったり、合成が困難なものも多い。またポリエチレン glycol (PEG) 等の高分子と該コア配列を連結する方法や、該コア配列を繰返すことによ\*

- [X] - Arg - Gly - Asp - [Y]

(II)

一般式(II)中、[ ]は[ ]内の残基が存在しても存在しなくてもよいことを意味するが、本発明においては[ ]内の残基は存在するほうが好ましい。存在する場合、XはAspまたはGlu残基を表し、YはSer、Thr、Val、Ser-Pro、Ser-Pro-Alaからなる群より選択されるアミノ酸残基またはペプチド残基を表す。ここでArg、Gly、Asp、Glu、Thr、Val、Pro、Alaはそれぞれアルギニン、グリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、スレオニン、バリン、プロリン、アラニンを表す。これらのアミノ酸残基(グリシン残基は除く)はL-体、D-体、ラセミ体のいずれでもよいが、好ましくはL-体で

50

ある。

【0014】本発明において、Arg-Gly-Aspなるトリペプチドを必須構成単位として有するオリゴペプチド残基、より好ましくは一般式(II)で表されるオリゴペプチド残基をそれを含む一般式(I)で表される誘導体とするのは、有効なペプチドの周辺を修飾することにより生体内酵素等による分解から保護したり、また高分子量にして徐放効果を付与することを意図したものである。また一般式(I)からも明らかなように、本発明のペプチド誘導体は、1分子中に2個のArg-Gly-Aspペプチドを必須構成単位として有するペプチド配列、より好ましくは一般式(II)で表されるペプチ

4

\*り高分子量化を行い、生体内での安定性向上させる方法も試みられているが、これらの方法では目的物の構造や分子量を特定して合成を行うことは極めて困難であり、この点で更に有効な物質の開発が必要とされていた。そこで本発明者らは細胞接着性蛋白質であるフィプロネクチンの持つ種々の生物活性を充分に保持し、合成も容易でかつ血液中での安定性の高い新規な化合物を求めて鋭意検討を行った結果、公知のフィプロネクチンコア配列ペプチド誘導体に比べて癌転移抑制能が大きく、さらに簡便な手段で合成可能な新規なペプチド誘導体を見出し、本発明を完成するに至った。従って本発明の目的は、細胞接着性蛋白質様の活性を充分に保持しており、簡便な手段で合成可能であり、血液中での安定性の高い新規なペプチド誘導体を提供することにある。本発明はさらに癌転移阻害活性の高い新規なペプチド誘導体を提供することを目的とする。本発明はさらに上記ペプチド誘導体を含有してなる薬物組成物の提供も目的とする。

## 【0010】

【課題を解決する手段】上記課題は、下記一般式(I)で表されるペプチド誘導体またはその薬学上許容できる塩を見出したことにより達成された。一般式(I)

## 【0011】

## 【化2】



【0012】一般式(I)中、Zは酸素原子または硫黄原子を表す。RはArg-Gly-Aspなるトリペプチドを必須構成単位として有する3残基以上7残基以下のオリゴペプチド残基を表す。このArg-Gly-Asp配列はペプチド鎖中あるいはその末端のいずれに存在していてもよく、またペプチド鎖のカルボキシ末端側は任意にアミド化されていてもよい。

【0013】さらに本発明においては、Rとしては下記一般式(II)で表されるオリゴペプチド残基をより好ましいものとして挙げることができる。一般式(II)

- [X] -

ある。

40

【0014】本発明において、Arg-Gly-Aspなるトリペプチドを必須構成単位として有するオリゴペプチド残基、より好ましくは一般式(II)で表されるオリゴペプチド残基をそれを含む一般式(I)で表される誘導体とするのは、有効なペプチドの周辺を修飾することにより生体内酵素等による分解から保護したり、また高分子量にして徐放効果を付与することを意図したものである。また一般式(I)からも明らかなように、本発明のペプチド誘導体は、1分子中に2個のArg-Gly-Aspペプチドを必須構成単位として有するペプチド配列、より好ましくは一般式(II)で表されるペプチ

ド配列を有することになる。従っていわゆるポリマー類とは異なり、分子構造は明確であることが特徴である。

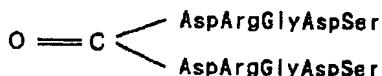
【0015】本発明のペプチド誘導体中に存在するイオン性基は、適当な対イオンと塩を形成していてもよい。塩の状態でも本発明の化合物はその生物学的活性を充分に維持する。ただしその塩は生理学的、薬理学的に許容されるものであることが必要である。具体的には塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩のような無機酸との塩、酢酸塩、乳酸塩、酒石酸塩等の有機酸との塩、さらにナトリウム塩、カリウム塩等が挙げられるが、なかでも塩酸塩、ナトリウム塩が特に好ましい。そのような塩への変換は慣用手段により行うことができる。

【0016】以下に本発明のペプチド誘導体の具体例を示すが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお該ペプチド誘導体のC末端が-OHの場合は、該分野の慣例によりその記載を省略する。またアミノ酸残基がD-体の場合はD-と表記するが、天然型のL-体の場合には特に表記していない。

【0017】

【化3】

化合物1



【0018】次に本発明の化合物の合成法について説明する。本発明のペプチド誘導体は、カルボニル基あるいはチオカルボニル基の両端にペプチド鎖が結合した、いわゆる尿素型化合物である。本発明のペプチド誘導体は種々の方法でこれを合成することが可能であるが、まず保護ペプチド部を合成のちアミノ末端側の保護基を除去し、これを尿素型化合物に誘導化し、しかるのちに保護基を除去することにより合成する方法が実用的かつ有利である。まずペプチド部の合成方法としては、特に限定しないが例えば固相法及び固相法を利用したペプチド自動合成装置による合成法が挙げられる。固相法及び固相法を利用したペプチド自動合成装置による合成法に関しては、生化学実験講座・タンパク質の化学IV p.207 (日本生化学会編、東京化学同人)、統生化学実験講座・タンパク質の化学(下) p.641 (日本生化学会編、東京化学同人)等に記載されている。

【0019】本発明の化合物のペプチド部は、液相法によって合成することも可能である。すなわちC末端成分となる保護アミノ酸から出発し、C末端を保護あるいは修飾ののちアミノ末端保護基を除去、以下保護アミノ酸残基を逐次縮合あるいはフラグメント縮合を行うことによりペプチド部の全保護体を合成する方法である。保護アミノ酸あるいは保護ペプチドを縮合する方法としては、公知の方法、例えば泉屋信夫ら編「ペプチド合成の基礎と実験」(丸善)に記載の方法のなかから適宜選択

することができるが、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールとDCCを用いるDCC-Additive法、あるいはカルボニルジイミダゾールを用いる縮合法が最も良い結果を与えた。

【0020】以上の方針により合成した保護ペプチドのアミノ末端保護基を除去し、これを尿素型化合物に誘導化する。アミン化合物を尿素型化合物に変換する方法としては、例えば新実験化学講座14「有機化合物の合成と反応(III)」P.1628 ~1644に記載の公知の方法のなかから適宜選択することができるが、適当な不活性溶媒中、カルボニルジイミダゾールあるいはチオカルボニルジイミダゾールとアミノ末端側アミノ基のみ遊離の保護ペプチドを反応させる方法が最も良い結果を与えた。

【0021】保護基の除去の条件は用いた保護基の種類に依存する。通常用いられる方法は、加水素分解、HF処理、トリフルオロメタンスルホン酸/チオアニソール/ $\alpha$ -クレゾール/トリフルオロ酢酸混合系処理等であるが、保護基の種類によってはさらにさまざまな方法也可能であることは言うまでもない。目的とするペプチド誘導体は脱保護ののち公知の方法、例えばイオン交換クロマトグラフィー、ゲル滲過クロマトグラフィーなどで精製することができる。

【0022】つぎに本発明のペプチド誘導体の作用及び用途について説明する。本発明のペプチド誘導体は、1分子中にArg-Gly-Asp(RGD)配列を複数個有し、さらにある程度の大きい分子量を有するために酵素分解や代謝によって排泄されにくく、そのため頗著な癌転移抑制活性を示す。本発明のペプチド誘導体は悪性細胞上のフィプロネクチン受容体に多点で作用し、フィプロネクチンへの結合を阻害することにより悪性細胞の接着、コロニー化、破壊的浸食を阻止するものと考えられる。本発明のペプチド誘導体は乳癌、表皮癌、筋線メラノーマ(muscle line melanoma)、表皮線神経芽細胞腫xグリオマ(epidermal line neuroblastoma x glioma)、軟骨細胞、フィプロザルコマを含め種々の細胞の接着及び転移を阻止するのに有効である。

【0023】さらに本発明のペプチド誘導体は、創傷治癒作用等の広範な生物活性が認められた。また本発明のペプチド誘導体はマウスを用いて毒性試験を行ったところ、毒性は全く認められなかった。

【0024】本発明のペプチド誘導体またはその薬学上許容可能な塩は、ペプチド系医薬に一般に使用されている投与方法によって使用することができ、通常賦形剤を含む薬物組成物として投与される。この薬物組成物はレミントンの薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences, Merck, 16, (1980))に開示されているように、知られているどのような方法で製造してもよい。賦形剤としては蒸留水、生理食塩水、リン酸塩あるいは酢酸塩のような緩衝塩類を含有する緩衝液、浸透圧調節剤としての塩化ナトリウムやショ糖、もしくはアスコルビン酸の

7  
のような酸化防止剤、または許容し得るこれらの組合せがある。

【0025】このような薬物組成物は溶液、錠剤の様な種々の形態とすることができます。投与形態としては経口、経鼻、非経口（静脈注射、皮下注射、腹腔内投与など）等のなかから適宜選択することができる。例えば生理食塩水に溶解して注射用製剤としてもよく、あるいは0.1規定程度の酢酸緩衝液に溶解したのち凍結乾燥剤としてもよい。またリボソーム中に内包したマイクロカプセル剤あるいはミクロスフェア等の形態で利用することも可能である。

【0026】また本発明のペプチド誘導体は他の薬理作用を有する化合物、より具体的には抗癌性化合物と併用して使用することも可能であり、これらは本発明の範疇に属するものである。本発明のペプチド誘導体と併用して使用することの可能な抗癌性化合物としては、癌化学療法において通常用いられる公知の制癌剤のなかから適宜選択する事が可能であるが、具体的にはアドリアマイシンやシスプラチニン、マイトマイシン等を挙げることが可能である。一般に従来の化学療法においては、制癌剤の副作用による危険性は避けられない問題であることが知られている。それゆえ本発明のペプチド誘導体との併用投与により制癌剤の投与量を減らし、制癌剤による副作用を軽減する事は非常に有用であると思われる。またこれは癌転移抑制効果をより向上させることをも意味す

る。本発明のペプチド誘導体は組成物中に通常0.1～99%（重量）含有され、その投与量はペプチド誘導体として1日あたり通常0.2 μg/kgから200 mg/kgの範囲であるが、患者の年齢、性別、体重、症状、投与方法によって決定されるものである。

【0027】

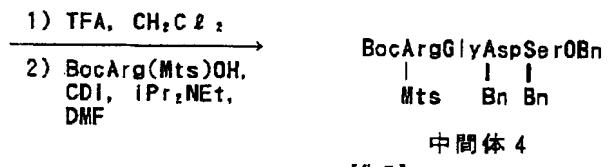
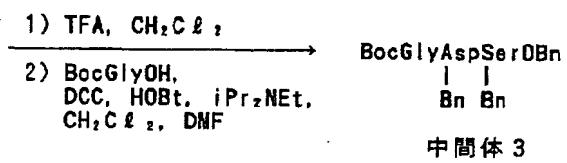
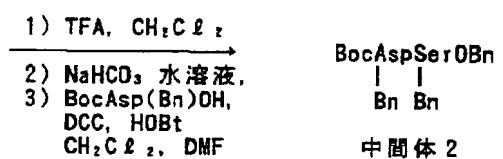
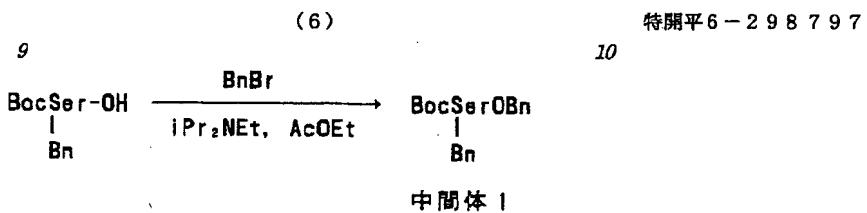
【実施例】以下実施例によって本発明を更に詳細に説明する。なお通常用いられる溶媒や試薬、保護基の表記には以下の略号を使用した。

10	【0028】 B o c	: t-ブトキシカルボニル
	B n	: ペンジル
	A c O E t	: 酢酸エチル
	M t s	: メシチレンスルホニル
	H O B t	: 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール
	D C C	: ジシクロヘキシリカルボジイミド
	i P r : N E t	: ジイソプロピルエチルアミン
	D M F	: ジメチルホルムアミド
	C D I	: カルボニルジイミダゾール
	T F A	: トリフルオロ酢酸
20	T F M S A	: トリフルオロメタンスルホン酸

【0029】実施例1 化合物1の合成  
化合物1の液相法による合成法について詳細に説明する。化合物1の合成経路を以下に示す。

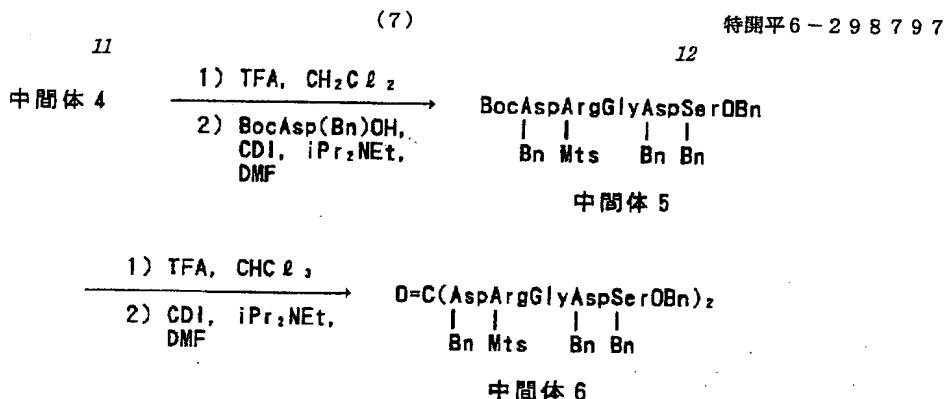
【0030】

【化4】



[0031]

[化5]



### 【0032】 1) 中間体1の合成

Boc-Ser(Bn)-OH (20.4 g, 69 mmol)、ベンジルプロミド (13 g, 76 mmol)、ジイソプロピルエチルアミン (9.8 g, 76 mmol) を酢酸エチル (100 mL) に溶解し、反応混合物を 5 時間加熱還流した。室温まで放冷した後生成した塩を濾過して除き、濾液を水、1 M クエン酸溶液、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥のち減圧濃縮して中間体 1 を無色油状物として得た。このものは精製することなく次の反応に用いた。

### 【0033】2) 中間体2の合成

前項記載の方法により得た中間体 1 の塩化メチレン (80 ml) 溶液にトリフルオロ酢酸 (80 ml) を加え、反応混合物を室温で 40 分間攪拌した。反応終了後減圧濃縮して大部分の溶媒を留去し、残渣を酢酸エチルで希釈し、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥ののち減圧濃縮してアミン体を無色油状物として得た。得られたアミン体と Boc-Asp(Bn)-OH (22.6 g, 70 mmol)、1-ヒドロキシベンソトリアゾール (10.7 g, 70 mmol) を DMF (80 ml) 及び塩化メチレン (80 ml) の混合溶媒に溶解し、氷冷しながら DCC (14.4 g, 70 mmol) を加えた。反応混合物を氷冷下 2 時間、更に室温まで昇温しながら終夜攪拌した後、セライト濾過して生成した沈殿を除去した。濾液を適当量の酢酸エチルで希釈し、水、5 % 炭酸ナトリウム溶液、1M クエン酸溶液、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥ののち減圧濃縮して油状物を得た。シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (溶出液：ヘキサン／酢酸エチル = 4 / 1) し、目的とする中間体 2 を無色結晶として 35.8 g (3段階で収率 87 %) 得た。

### 【0034】 3) 中間体3の合成

中間体 2 (35.7 g, 60.5 mmol) の塩化メチレン (100 ml) 溶液にトリフルオロ酢酸 (100 ml) を加え、反応混

20 合物を室温で40分間攪拌した。反応終了後溶媒を留去し、残渣をエーテルから結晶化させてトリフルオロ酢酸塩32.5 gを得た。得られたトリフルオロ酢酸塩(18.9 g, 31.3 mmol)とBoc-Gly-OH(5.75 g, 33 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(5.04 g, 33 mmol)、ジイソプロピルエチルアミン(4.45 g, 34.4 mmol)をDMF(20 ml)及び塩化メチレン(50 ml)の混合溶媒に溶解し、氷冷しながらDCC(6.8 g, 33 mmol)を加えた。反応混合物を氷冷下2時間、更に室温まで昇温しながら終夜攪拌した後、セライト濾過して生成した沈殿を除去した。濾液を適定量の酢酸エチルで希釈し、水、5%炭酸ナトリウム溶液、1Mクエン酸溶液、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥ののち減圧濃縮して無色固体物を得た。このものをヘキサン/酢酸エチル(2/1)から再結晶して中間体3を17.9 g(87%)得た。

【0035】4) 中間体4の合成  
 中間体3 (17.9 g, 27 mmol) の塩化メチレン (60 ml) 溶液にトリフルオロ酢酸 (60 ml) を加え、反応混合物を室温で1時間攪拌した。反応終了後溶媒を留去し、残渣をエーテルから結晶化させてトリフルオロ酢酸塩 15.9 gを得た。一方、Boc-Arg(Mts)-OH (4.56 g, 10 mmol) を DMF 40 (20 ml) に溶解し、このものに氷冷しながら CDI (1.63 g, 10 mmol) の DMF (10 ml) 溶液を加えた。反応混合物を氷冷しながら1時間攪拌したのち、上記操作により得られたトリフルオロ酢酸塩 (6.61 g, 10 mmol) とシソプロピルエチルアミン (1.42 g, 11 mmol) の DMF (20 ml) 溶液を加えた。反応混合物を氷冷下2時間、更に室温まで昇温しながら終夜攪拌した後、減圧下溶媒を留去した。残渣を適量のクロロホルムで希釈し、水、1Mクエン酸溶液、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥ののち減圧濃縮した。残渣をエーテル 50 から結晶化させて目的とする中間体4を無色結晶として

13

9.8 g (定量的) 得た。

FAB-MS: (M+H)<sup>+</sup> 986.

## 【0036】5) 中間体5の合成

中間体4 (5.5 g, 5.6 mmol) の塩化メチレン (20 ml) 溶液にトリフルオロ酢酸 (20 ml) を加え、反応混合物を室温で1時間攪拌した。反応終了後溶媒を留去し、残渣をエーテルから結晶化させてトリフルオロ酢酸塩を5.3 g得た。一方、Boc-Asp(Bn)-OH (1.71 g, 5.3 mmol) をDMF (10 ml) に溶解し、このものに氷冷しながらCDI (860 mg, 5.3 mmol) のDMF (10 ml) 溶液を加えた。反応混合物を氷冷しながら1時間攪拌したのち、上記操作により得られたトリフルオロ酢酸塩 (5.3 g, 5.3 mmol) とジイソプロピルエチルアミン (770 mg, 6.0 mmol) のDMF (15 ml) 溶液を加えた。反応混合物を氷冷下2時間、更に室温まで昇温しながら終夜攪拌した後、減圧下溶媒を留去した。残渣を適量のクロロホルムで希釈し、水、1 M クエン酸溶液、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥のち減圧濃縮した。残渣をエーテルから結晶化させて目的とする中間体5を無色結晶として5.9 g (94.3 %) 得た。

FAB-MS: (M+H)<sup>+</sup> 1191.

## 【0037】6) 中間体6の合成

中間体5 (5.0 g, 4.2 mmol) のクロロホルム (20 ml) 溶液にトリフルオロ酢酸 (20 ml) を加え、反応混合物を室温で1時間攪拌した。反応終了後溶媒を留去し、残渣をエーテルから結晶化させてトリフルオロ酢酸塩を4.9 g得た。得られたトリフルオロ酢酸塩 (1.4 g, 1.2 mmol) をジイソプロピルエチルアミン (190 mg, 1.5 mmol) 及びDMF (5 ml) からなる混合溶媒に溶解し、CDI (97 mg, 0.6 mmol) を加えた。反応混合物を室温で終夜放置したのち減圧下溶媒を留去した。残渣を適量のクロロホルムで希釈し、水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトウ \* 20

10

20

30

表1

\*リウムで乾燥のち減圧濃縮した。残渣をエーテルから結晶化させて目的とする中間体6を1.2 g (90.6 %) 得た。

FAB-MS: (M+H)<sup>+</sup> 2207.

## 【0038】7) 化合物1の合成

中間体6 (1.1 g, 0.5 mmol) のトリフルオロ酢酸 (7 ml) 溶液に、トリフルオロメタンスルホン酸 (6 g)、チオアニソール (4 ml)、m-クレゾール (3.5 ml)、トリフルオロ酢酸 (18 ml) からなる混合溶液を氷冷しながら加え、反応混合物を氷冷下2時間攪拌した。反応液をエーテル (700 ml) に滴下して30分間ゆっくり攪拌した。沈殿した粗生成物を少量の水にとかし、イオン交換クロマトグラフィー (アンバーライト IRA-400、対イオンCl<sup>-</sup>) により精製、凍結乾燥して目的とする化合物1を無色粉末として420 mg (75 %) 得た。

FAB-MS: (M+H)<sup>+</sup> 1121.

【0039】実施例2 メラノーマ細胞を用いた実験的肺転移モデル系による癌転移抑制作用に関する検討

本発明のペプチド誘導体の癌転移抑制作用について、実験的肺転移モデル系によって検討した。実施例に記載した本発明の化合物1と、比較例としてフィブロネクチンの接着コア配列ペプチドであるArg-Gly-Asp-Serを用いた。これらのペプチド各々1000 μgと非常に転移性の強い癌細胞であるB16-BL6メラノーマ細胞 (対数増殖期のもの5 × 10<sup>4</sup> 個) を各々PBS 0.2 ml中で混合し、これを1群5匹のC57BL/6の雌マウスに尾静脈注射により投与した。投与後14日目にマウスを屠殺、解剖し、肺に転移した癌のコロニー数を計測して対照のPBS投与群と比較した。その結果を以下の表1に示す。

## 【0040】

【表1】

投与化合物	肺への転移数	
	平均±SD	(範囲)
PBS (未処理)	154±35	(116-206)
Arg-Gly-Asp-Ser	160±48	(94-239)
化合物1	49±21	(27-78) *

\* t-検定で未処理区と比較して P&lt;0.001

【0041】この結果によれば、本発明の化合物1の投与によって肺への癌転移は有意に抑制された。これに対し従来から知られているフィブロネクチンの接着コア配列ペプチドであるArg-Gly-Asp-Serは、マウス1匹あたり1000 μgの投与量では転移抑制効果を示さなかった。

【0042】実施例3 メラノーマ細胞を用いた自然肺転移モデル系による癌転移抑制作用の検討  
本発明の化合物の癌転移抑制作用について、より現実的

な病態治療モデルである自然肺転移抑制試験により検討した。本発明の化合物1と、比較化合物としてフィブロネクチンの接着コア配列ペプチドであるArg-Gly-Asp-Serを用いた。1群7匹のC57BL/6の雌マウスを用い、これらの右足かかと部分にB16-BL6メラノーマ細胞 (対数増殖期のもの5 × 10<sup>4</sup> / 50 μl) を移植した。移植後14、16、18、20、22、24、26日目に被試験化合物を尾静脈注射により投与した (1回あたり100 μg/200 μl PBS)。

(9)

特開平6-298797

15

移植癌は21日目に外科的に切除した。メラノーマ移植後  
35日目にマウスを屠殺、解剖し、肺に転移した癌のコロ  
ニー数を計測して対照のPBS投与群と比較した。その結果\*

表2

16

\*果を以下の表2に示す。  
【0043】  
【表2】

投与化合物	肺への転移数	
	平均±SD	(範囲)
PBS (未処理)	59±12	(47-79)
Arg-Gly-Asp-Ser	63±20	(47-96)
化合物1	32±18	(3-59)*

\* t-検定で未処理区と比較して P<0.01

【0044】この結果によれば、本発明の化合物1の投与によって、現実的な病態治療モデルである自然肺転移抑制試験においても癌の転移数は有意に抑制された。これに対して、従来から知られているフィプロネクチンの接着コア配列ペプチドであるArg-Gly-Asp-Serには、自然肺転移モデル系における癌転移の抑制効果はなかった。この実験事実は、本発明の重要な目的の1つである修飾による活性の増強が目論見通り達成されていることを示している。従って本発明のペプチド誘導体の癌転移抑制効果、およびその有用性、優位性は明白である。

【0045】以上実施例により本発明を特定の例に関して説明したが、限定して解釈されるべきではない。本発

明の本質及び範囲から逸脱しない種々の変更や修正が可能であることは明らかである。そしてそのような発明は本発明に含まれると考える。

【0046】  
【発明の効果】以上説明したように本発明のペプチド誘導体は細胞接着性蛋白質であるフィプロネクチンのコア配列と比較して細胞接着性が大きく、癌転移抑制作用等の種々の生物活性を充分に保持し、毒性の問題もほとんど無い。さらにより現実的な病態治療モデルである自然肺転移抑制試験においても癌転移抑制作用を示す。またその構造は単純であるため合成も容易であり、医薬として価値の高いものである。

---

#### フロントページの続き

(72)発明者 済木 育夫

北海道札幌市厚別区厚別北3条西5丁目12

- 6

(72)発明者 東 市郎

北海道札幌市南区真駒内上町5丁目3-2